

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s): OOE, Norihisa; MATSUNAGA, Haruyuki

Application No.:

Group:

Filed: April 14, 2000

Examiner:

For: CELL FOR MEASURING THE ABILITY TO CONTROL THE ACTIVITY OF A
LIGAND-RESPONSIVE TRANSCRIPTION CONTROL FACTOR



L E T T E R

Assistant Commissioner for Patents
Box Patent Application
Washington, D.C. 20231

April 14, 2000
2185-0424P-SP

Sir:

Under the provisions of 35 USC 119 and 37 CFR 1.55(a), the applicant hereby claims the right of priority based on the following application(s):

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Filed</u>
JAPAN	H11-106791	04/14/99
JAPAN	H11-106792	04/14/99
JAPAN	H11-106793	04/14/99
JAPAN	H11-107774	04/15/99

A certified copy of the above-noted application(s) is(are) attached hereto.

If necessary, the Commissioner is hereby authorized in this, concurrent, and future replies, to charge payment or credit any overpayment to deposit Account No. 02-2448 for any additional fees required under 37 C.F.R. 1.16 or under 37 C.F.R. 1.17; particularly, extension of time fees.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By: 

GERALD M. MURPHY, JR.

Reg. No. 28,977

P. O. Box 747

Falls Church, Virginia 22040-0747

Attachment
(703) 205-8000
/cw

IN THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE
I N F O R M A T I O N S H E E T



Applicant: OOE, Norihisa
 MATSUNAGA, Haruyuki

Application No.:

Filed: April 14, 2000

For: CELL FOR MEASURING THE ABILITY TO CONTROL THE ACTIVITY OF A
 LIGAND-RESPONSIVE TRANSCRIPTION CONTROL FACTOR

Priority Claimed:

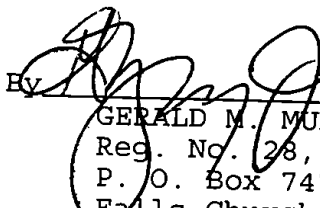
COUNTRY	DATE	NUMBER
JAPAN	04/14/99	H11-106791
JAPAN	04/14/99	H11-106792
JAPAN	04/14/99	H11-106793
JAPAN	04/15/99	H11-107774

Send Correspondence to: BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP
 P. O. Box 747
 Falls Church, Virginia 22040-0747
 (703) 205-8000

The above information is submitted to advise the USPTO of all relevant facts in connection with the present application. A timely executed Declaration in accordance with 37 CFR 1.64 will follow.

Respectfully submitted,

BIRCH, STEWART, KOLASCH & BIRCH, LLP

By 
GERALD M. MURPHY, JR.
Reg. No. 28,977
P. O. Box 747
Falls Church, VA 22040-0747

/cw

(703) 205-8000

Birch, Stewart, Kolasch & Birch

703-205-8000

2185-0424P

日本国特許庁 005, NORIHIRO et al.
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT
4/14/00
1074

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 4月14日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第106791号

出願人

Applicant(s):

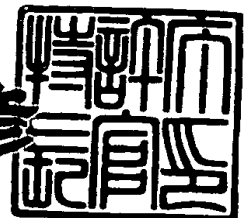
住友化学工業株式会社



2000年 3月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3013681

【書類名】 特許願

【整理番号】 P150270

【提出日】 平成11年 4月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能の測定用細胞

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友化学工業株式会社内

【氏名】 大江 師久

【特許出願人】

【識別番号】 000002093

【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

【識別番号】 100093285

【弁理士】

【氏名又は名称】 久保山 隆

【電話番号】 06-6220-3404

【選任した代理人】

【識別番号】 100094477

【弁理士】

【氏名又は名称】 神野 直美

【電話番号】 06-6220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能の測定用細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) エストロゲンレセプター遺伝子を発現し、(2) 染色体に、(a) エストロゲンレセプター認識配列と動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含む DNA が導入されてなることを特徴とする動物細胞。

【請求項 2】

染色体に、(1) 動物細胞で機能可能なプロモーターの下流に機能的に接続されてなるエストロゲンレセプター遺伝子、および、(2) (a) エストロゲンレセプター認識配列と動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含む DNA が導入されてなる請求項 1 記載の動物細胞。

【請求項 3】

最小プロモーターが実質的に TATA ボックスからなるプロモーターである請求項 1 または 2 記載の動物細胞。

【請求項 4】

エストロゲンレセプターがエストロゲンレセプター α である請求項 1～3 記載の動物細胞。

【請求項 5】

エストロゲンレセプターがエストロゲンレセプター β である請求項 1～3 記載の動物細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能の測定用細胞に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロゲン様作用または抗エストロゲン様作用を示すことが報告されている。かかる化学物質の作用は、動物のホルモンバランスを崩し生態系の混乱や疾患の原因等となることが危惧されることから、化学物質の安全性評価の一環として化学物質のエストロゲン様作用および抗エストロゲン様作用を測定する試みがなされている。

エストロゲンの作用機序として、エストロゲンの標的細胞に存在するエストロゲンレセプターにエストロゲンが結合すると、該レセプターが活性化され、染色体上の標的遺伝子の転写調節領域に存在するエストロゲンレセプター認識配列に結合し、標的遺伝子の転写を促進する。そこで、化学物質のエストロゲン様作用または抗エストロゲン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能を測定することのできる試験系の開発が切望されていた。

【0003】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、エストロゲンレセプターの転写調節能に対する化学物質の作用を測定するために用いることのできる凍結保存可能な動物細胞を作出することに成功し、本発明に至った。

即ち、本発明は、

- (1) エストロゲンレセプター遺伝子を発現し、
- (2) 染色体に、
 - (a) エストロゲンレセプター認識配列と動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含むDNA

が導入されてなることを特徴とする動物細胞（以下、本発明細胞と記す。）を提

供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】

以下、さらに詳細に本発明を説明する。

本発明細胞を調製するに際し、DNAを導入する宿主細胞として用いることのできる動物細胞としては、例えばヒト、マウス、ラット等由来の哺乳動物細胞や昆虫動物細胞などがあげられ、操作性や再現性を考慮すると安定に継代可能な細胞が好ましい。より具体的には、例えば、ヒト由来のMCF7細胞、T47D細胞、ヒト由来のHeLa細胞、マウス由来のNIH3T3細胞[いずれも、American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能]などがあげられる。これらのうち、HeLa細胞、NIH3T3細胞等のエストロゲンレセプター非内在性細胞は、該細胞にエストロゲンレセプター遺伝子を導入し該遺伝子の発現能を付与して使用する。MCF7細胞、T47D細胞等のエストロゲンレセプター遺伝子を発現している細胞はそのまま宿主細胞として用いてもよく、また、該遺伝子を導入して該遺伝子の発現量を増大させて使用してもよい。

宿主細胞に導入されるエストロゲンレセプター遺伝子としては、ヒトエストロゲンレセプター α 遺伝子 (GenBank Accession No.X03635)、ヒトエストロゲンレセプター β 遺伝子 (Biochem.Biophysical.Research.Com.,243,122-126(1998))、ラットエストロゲンレセプター α 遺伝子 (GenBank Accession No.X61098)、ラットエストロゲンレセプター β 遺伝子 (GenBank Accession No.U57439)、マウスエストロゲンレセプター α 遺伝子 (GenBank Accession No.M38651) 等に由来するcDNA遺伝子があげられる。これらの遺伝子はその翻訳開始コドンATGの上流にKozakのコンセンサス配列 (Nucleic Acids Res., 12, 857-872 (1984)) が連結されていてもよい。

かかるエストロゲンレセプター遺伝子を宿主細胞で発現させるには、該遺伝子を、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流に機能的に接続された形でベクターに挿入し、宿主細胞に導入するとよい。「プロモーターの下流に機能的に接続された」とは、宿主細胞において発現するようにプロモーターと結合された形を意味する。動物細胞で機能可能なプロモーターとしては、ラウス肉腫ウィルス (

RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期もしくは後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス (MMTV) プロモーター等があげられる。また、ベクターとしては、大腸菌中での複製起点および薬剤耐性マーカー遺伝子を有するプラスミド等があげられ、前記のようなプロモーターを有しその下流に遺伝子挿入部位を有する市販の発現用ベクターを利用してよい。動物細胞で機能可能なプロモーターの下流に機能的に接続されてなるエストロゲンレセプター遺伝子が組込まれたベクターのDNAを宿主細胞に導入し、該遺伝子が染色体に導入された安定形質転換細胞を取得すると、試験に使用するたびに一過性に遺伝子導入を行う手間を省くことができる。このようなエストロゲンレセプター遺伝子を含むDNAは、レポーター遺伝子と細胞選択マーカー遺伝子とを含む後述のDNAと同時に、宿主細胞へ導入されてもよいし、別々に順次導入されてもよい。かかるエストロゲンレセプター遺伝子を含むDNAには、宿主細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子であって、後述のレポーター遺伝子の導入用に用いられるDNAに含まれる細胞選択マーカー遺伝子とは異なる形質をコードする遺伝子が同一分子上に含まれていると、形質転換細胞の選択がより容易となる。

【0005】

エストロゲンレセプターの転写調節を受ける遺伝子の転写活性の指標とするレポーター遺伝子としては、その転写産物 (レポーター蛋白質) の有する酵素活性等に基づいて発現量が測定できる遺伝子が、発現量の測定が容易である点で好ましく、例えば、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼなどの酵素蛋白質をコードする遺伝子があげられる。

前記のレポーター遺伝子は、宿主細胞においてエストロゲンレセプターの転写調節下に発現させるために、エストロゲンレセプター認識配列と最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されている。ここで、「エストロゲンレセプター認識配列」とは、一般にエストロゲン応答配列 (estrogen response element; ERE) とも呼ばれる特定の塩基配列であって、エストロゲンレセプターによって転写活性が調節される標的遺伝子の転写調節領域

に在し、例えばエストロゲンとエストロゲンレセプターとの複合体が、該配列を認識しここに結合してエストロゲン依存性に標的遺伝子の転写を促進する。このようなエストロゲンレセプター認識配列としては、具体的には例えば、アフリカツメガエルのピテロゲニン遺伝子の5'上流領域の塩基配列 (Cell., 57, 1139-1146) 等があげられる。かかる塩基配列を有するDNAは、化学合成するか、PCR法などにより増幅しクローニングする等により調製することができる。また、EREのコンセンサス配列 [5'-AGGTCAⁿnnTGACCTT-3'] を1回以上含む塩基配列からなるDNAを化学合成して用いてもよい。尚、十分な転写調節能を得るには、前記のコンセンサス配列は通常2~5程度タンデムに連結されていることが好ましい。

また、「最小プロモーター」とは、RNAポリメラーゼIIによる転写開始部位を決定し最低限の転写水準維持に関与するDNA領域であって、コアプロモーターともいわれ、通常、遺伝子の転写開始部位付近の比較的狭い部分にみられる領域である。このような領域の塩基配列としては、例えば、TATAボックスおよび転写開始点近傍の塩基配列があげられ、具体的には例えば、マウスのメタロチオネインI遺伝子の5'上流領域の-33番目 (転写開始点を+1番目とする。以下、同様。) の塩基から+15番目の塩基までの塩基配列 (Genbank Accession No. J00605) や、チキンオボアルブミン遺伝子の5'上流領域の-40番目の塩基から+10番目の塩基までの塩基配列 (Genbank accession No. J00895) 等があげられる。本発明細胞において用いられる「最少プロモーター」の転写活性としては、例えば、単純ヘルペスウイルス (HSV) 由来のチミジンキナーゼ (tk) 遺伝子の5'上流領域の-130番目の塩基から+53番目の塩基までの塩基配列 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78, 1441-1445 (1981)) からなるDNA領域の転写活性よりも弱い活性であると、転写活性を測定する際の構成的なバックグラウンド転写活性が低くなりリガンド応答性の転写活性の検出が感度よく行える点から好ましい。上記のような塩基配列からなるDNAは、例えば、その塩基配列に基づいて化学合成することなどにより調製することができる。

「リガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域」とは、転写調節に関わる主たる機能性エレメントとして、目的とするリガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとのみを

含む転写制御領域を意味し、例えば他の転写調節因子の認識配列等の転写調節に関わる他の機能性エレメントを含まないか、または、かかる機能性エレメントを含んでいても、それは前記リガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとによる転写調節能を本質的に変化させることのない配列であることを意味する。

また、「転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子」とは、導入される宿主細胞において該転写調節領域の制御下に発現するように、該転写調節領域と接続された状態にあるレポーター遺伝子を意味する。

【0006】

本発明細胞を作製するに際し、宿主細胞の形質転換に用いられるDNAには、上記のレポーター遺伝子の他に、宿主細胞（動物細胞）で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子が含まれる。「細胞選択マーカー遺伝子」とは、該遺伝子を含むDNAで形質転換された細胞を非形質転換細胞と見分ける際に目印となり得る表現形質をコードする遺伝子である。「動物細胞で機能可能な」とは、動物細胞で前記形質を発現することができることを意味し、例えば、動物細胞で転写開始能を有するプロモーターの制御下にあつて動物細胞で発現可能な状態にある遺伝子であつて、動物細胞で有効な細胞選択用の表現形質をコードする遺伝子があげられる。動物細胞で有効な細胞選択マーカー遺伝子としては、例えば、動物細胞の増殖を抑制または阻害する薬剤に対する耐性を細胞に付与することの可能な遺伝子をあげることができ、具体的には例えば、ネオマイシン耐性付与遺伝子（アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子）、ハイグロマイシン耐性付与遺伝子（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子）、ブラストサイジンS耐性付与遺伝子（ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子）などが挙げられ、形質転換細胞の選抜がより短期間で行える点でブラストサイジンS耐性付与遺伝子を好ましくあげることができる。ブラストサイジンS耐性付与遺伝子は、例えば、市販のプラスミドpUCSV-BSDなどから得ることができる。

【0007】

「(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子

と (b) 該動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含む DNA」は、例えばこれらの遺伝子を同一ベクター上に組込むことによって調製される。ベクターとしては、取扱い易く、ベクター分子内または分子間の遺伝子組換えや安定形質転換細胞における染色体からの脱落等が起こる頻度が低くなると期待される点から、コンパクトな大きさであることが望ましく、例えば、およそ 2 kb ~ 10 kb 程度のプラスミドがあげられる。また、該ベクターに遺伝子を組込むにあたって大腸菌を宿主として使用すると効率よく操作を行うことができる点から、大腸菌ベクターとしての機能、すなわち大腸菌内で機能可能な複製起点、薬剤耐性遺伝子、遺伝子挿入用制限酵素認識部位等を有していることが好ましい。より具体的には例えば、ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (レポーター遺伝子) を保有するプラスミドの該遺伝子の upstream に、アフリカツメガエルのピテログニン遺伝子の 5' upstream 領域に由来しエストロゲンレセプター認識配列を含む塩基配列からなる DNA とマウスメタロチオネイン I 遺伝子由来の最小プロモーターとを組込み、さらに、該プラスミドに、例えば SV40 初期プロモーターに接続されてなるプラスミドサイジン S 耐性付与遺伝子を組込むことにより、上記の構成の DNA を調製することができる。

【0008】

本発明細胞を調製するには、例えば、前記のようにして調製された (「(a) リガンド応答性転写調節因子認識配列と最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と (b) 該動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含む DNA」) を宿主細胞に導入し、安定形質転換細胞を選抜するとよい。具体的には例えば、まず、MCF7細胞などの宿主細胞をシャーレに播き ($10^5 \sim 10^7$ 細胞/直径 6~10cm シャーレ)、5~10% 程度の血清を含有する α MEM 培地等を用いて、5% CO_2 および飽和湿度条件下に 37℃ で数時間 ~ 一晩程度培養する。このようにして培養した細胞へ、上記 DNA を導入する。DNA 導入法としては、エレクトロポレーション法、磷酸カルシウム法、リポフェクション法等の一般的な方法があげられる。具体的には例えば、市販のリポフェクトアミン (GIBCO 製) を用いる場合には、添付のマニュアルに従って操作を行なうとよい。細胞量に対するリポフェクトアミンの

量、導入されるDNAの量などについて予備検討を行い最適条件を求めておくといよい。宿主細胞に導入されるDNAの純度としては、CsCl密度勾配遠心法で精製したプラスミドDNAまたはそれとほぼ同等の純度が望ましい。宿主細胞に導入されるDNAの形状としては、上記のようなレポーター遺伝子と細胞選択マーカー遺伝子とが組込まれたプラスミドのDNAが環状のまま宿主細胞へ導入されてもよいが、一般的には、各遺伝子の発現に影響を与えない領域に存在する制限酵素部位で切断されることにより直鎖状とされたDNAが、宿主細胞に導入されるとよい。

導入されたDNAによって安定に形質転換された細胞を取得するには、まず、前記のようにしてDNAが導入された細胞を、通常の細胞培養液（培地）中で一日程度そのまま培養する。次に、細胞を常法（トリプシン処理等）に従って剥がして播き直した後、直ちに、宿主細胞へ導入された細胞選択マーカー遺伝子に対応する選択条件下に培養を開始する。即ち、細胞選択マーカー遺伝子が薬剤耐性付与遺伝子である場合は、形質転換細胞に耐性が付与される薬剤を培地に加え、形質転換細胞に由来するコロニーが適当な大きさになるまで該薬剤存在下で培養を続ける。この間必要に応じて、薬剤が添加された新しい培地への培地交換を1～3回/週の割合で行う。

このようにして得られたコロニーを複数に分割して植え直し、細胞を増殖させた後、その一部に、目的とするエストロゲンレセプターのリガンドの溶媒溶液を添加して24時間程度培養した後、レポーター遺伝子の発現量を測定する。また、対照として、溶媒のみを添加した系の発現量を測定する。レポーター遺伝子の発現量の測定法は、用いる個々のレポーター遺伝子の種類によるが、レポーター遺伝子産物が培地に分泌される場合を除き、一般的には細胞溶解剤処理や超音波処理等で該細胞の細胞膜を破壊して細胞抽出液を調製し、該抽出液に含まれるレポーター遺伝子産物を定量する。例えば、レポーター遺伝子産物が酵素蛋白質である場合は、前記抽出液中の酵素蛋白質を該酵素に特異的な基質と反応させ、生ずる発光量、蛍光量、吸光度などを測定することによりレポーター遺伝子産物による酵素活性を定量し、レポーター遺伝子産物量、ひいては、レポーター遺伝子の発現量の指標とする。このようにして細胞をリガンドと接触させた系のレポーター遺伝子の発現量が、溶媒のみを添加した系におけるレポーター遺伝子の発現

量に対して少なくとも2倍以上、好ましくは5倍以上高い値を示した細胞を選択する。なお、このようにして得られた細胞が単一の形質転換細胞で構成されていない場合には、該細胞を限界希釈培養し、単一の細胞からなるコロニーを選択してもよい。

【0009】

以上のようにして得られる本発明細胞は、例えば、エストロゲンレセプターに対して、アゴニスト作用を示す化学物質や、アンタゴニスト作用を示す化学物質の同定に利用することができる。

具体的には、まず、本発明細胞を細胞培養容器に播種し培養する。例えば96穴プレートを使用する場合は、通常、1穴あたり 10^3 から 2×10^4 個程度の細胞を播種し、数時間～一晚程度培養するとよい。また、血清が添加された培地を培養に用いる場合には、培地に加える血清を例えば活性炭等で処理して血清中に含まれるリガンドをあらかじめ除いておいてもよい。次いで、かかる細胞培養液に被験化学物質を添加する。被験化学物質のアゴニスト活性を測定する場合には、被験化学物質を溶媒に溶解させた溶液、または、溶媒のみを、培養液における溶媒の最終体積濃度が通常0.5%～2%以下になるようにして前記の細胞培養液に添加する。また、被験化学物質のアンタゴニスト活性を測定する場合には、エストロゲンレセプターのリガンド、例えば 17β -エストラジオールを溶媒に溶解させた溶液が、培養液における該リガンドの濃度が通常 EC_{50} 程度となるように前記培養液に添加された系、および、前記の系にさらに被験化学物質が添加された系を調製する。上記のようにして培養液に添加される溶媒には、例えば、蒸留水、ジメチルスルフォキシド (DMSO)、エタノール等が用いられる。また、被験化学物質を水溶液として添加する場合には、該水溶液をポアサイズ $20\mu m$ 以下のフィルターなどでろ過滅菌した後に培養系に添加するとよい。

前記の細胞を、例えば、数時間以上72時間程度まで培養した後、上述のようにレポーター遺伝子の発現量を測定する。例えば、レポーター遺伝子がホタルルシフェラーゼ遺伝子である場合には、まず培養上清を除去した後、器壁に接着した細胞をPBS(-)等で洗い、該細胞に細胞溶解剤などを添加して細胞を破壊し細胞抽出物を調製する。この細胞抽出物をレポーター遺伝子産物であるルシフェラー

ぜの試料として、ルシフェラーゼの基質であるルシフェリンと反応させ、生ずる発光量を定量する。被験化学物質のアゴニスト活性を測定する試験系において、溶媒のみが添加された系の細胞よりも、被験物質が添加された系の細胞の方が、細胞あたりのルシフェラーゼ活性が高い、すなわち、レポーター遺伝子産物量が多い場合は、その被験物質はエストロゲンレセプターに対してアゴニスト活性を示すと判断される。また、被験化学物質のアンタゴニスト活性を測定する試験系において、エストロゲンレセプターのリガンドのみが添加された系の細胞のルシフェラーゼ活性に比較して、該リガンドと被験化学物質とが添加された系の細胞のルシフェラーゼ活性が低い場合には、その被験物質はエストロゲンレセプターに対してアンタゴニスト活性を持つと判断される。

【0010】

上述のようにして、本発明細胞を用いてエストロゲンレセプターの転写調節を受ける遺伝子の転写活性を種々の化学物質の存在下に測定することができ、かかる測定値に基づいてエストロゲンレセプターの転写調節能に対する化学物質の作用を評価することができ、エストロゲンレセプターに対するアゴニストやアンタゴニストを同定することができる。かかる評価、同定方法は、エストロゲン様作用または抗エストロゲン様作用を有する内分泌攪乱化学物質等の検出に利用することができ、また、エストロゲンレセプターをターゲットとする医薬品の有効成分の探索に利用することもできる。

本発明細胞は凍結保存が可能であり、必要に応じて起眠して使用することができる。本発明細胞を試験に用いることにより、レポーター遺伝子が一過性に導入された細胞を用いる場合と比較して、試験毎の遺伝子導入や細胞選抜等の煩雑な操作を省くことができ、また、一定の性能の細胞を試験に用いることができることから、再現性良く測定することが可能となる。よって、本発明細胞は、例えばハイスループットスクリーニング等の自動化された大規模スクリーニング法により上述のような化学物質の探索や検出等を行う際にも有用である。

【0011】

【実施例】

以下に、実施例および試験例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発

明はこれらに限定されるものではない。

【0012】

実施例 1 (レポーター遺伝子と細胞選択マーカー遺伝子とを含むプラスミドの作製)

エストロゲンレセプター認識配列を含むアフリカツメガエル由来ピテロゲニン遺伝子上流の塩基配列 (5'-TCGACAAAAGTCAGGTCACAGTGACCTGATCAAG-3') からなるオリゴヌクレオチドおよび該塩基配列と相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを DNA 合成機にて合成し、これらをアニーリングさせて 2 本鎖 DNA (該 DNA を、以下、ERE DNA と記す。) とした後、T4 リガーゼを作用させて該 2 本鎖 DNA をタンデムに結合させ、これに T4 ポリヌクレオチドカイネースを作用させてその両末端をリン酸化した。

マウスメタロチオネイン I 遺伝子の TATA box 近傍の塩基配列とリーダー配列に由来する塩基配列からなる 2 本のオリゴヌクレオチド; 5'-GATCTCGACTATAAAGAGGGCAGGCTGTCCTCTAAGCGTCACCACGACTTCA-3'、および、5'-AGCTTGAAGTCGTGGTGACGCTTAGAGGACAGCCTGCCCTCTTTATAGTCGA-3' をアニーリングさせて 2 本鎖 DNA とし、これに T4 ポリヌクレオチドカイネースを作用させてその両末端をリン酸化した (該 DNA を、以下、TATA DNA と記す。)。一方、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を含むプラスミド pGL3 (プロメガ社製) を制限酵素 Bgl II および Hind III で消化した後、これに Bacterial alkaline phosphatase (BAP) を加えて 65℃ で 1 時間保温した。次いで、該保温液を低融点アガロース (Agarose L; ニッポンジーン社製) を用いた電気泳動に供し、バンド部分のゲルから DNA を回収した。該 DNA 約 100ng と、前記の TATA DNA 1 μg とを混合し、T4 リガーゼで結合させることによりプラスミド pGL3-TATA を作製した。

次に、pGL3-TATA を制限酵素 Sma I で消化した後、BAP を加えて 65℃ で 1 時間保温した。該保温液を低融点アガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルから DNA を回収した。該 DNA 約 100ng と、上記のタンデムに結合させ末端をリン酸化した ERE DNA 約 1 μg とを混合して T4 リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌 DH5 α コンピテントセル (TOYOBO 製) へ導入した。アンピシリン耐性を示した大腸菌のコロニー数個からそれぞれの保有するプラスミ

ドのDNAを精製し、これらを制限酵素Kpn IおよびXho Iで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。pGL3-TATAのSma I部位にERE DNAがタンデムに5コピー導入された構造を有するプラスミドを選択し、これをプラスミドpGL3-TATA-EREx5と名づけた。

次いで、プラスミドpUCSV-BSD（フナコシ社から購入）をBamHIで消化し、ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットをコードするDNAを調製した。該DNAと、前記プラスミドpGL3-TATA-EREx5をBamHIで消化しBAP処理して得られたDNAとを混合して、T4リガーゼを反応させた後、該反応液を大腸菌DH5 α コンピテントセルに導入した。得られたアンピシリン耐性の大腸菌クローンからプラスミドDNAを調製し、それぞれを制限酵素Bam HIで消化して該消化液をアガロースゲル電気泳動で分析した。ブラストサイジンSデアミナーゼ遺伝子発現カセットがBam HIサイトに導入された構造を有するプラスミドを選択し、プラスミドpGL3-TATA-EREx5-BSDと名づけた。

【0013】

実施例2 （エストロゲンレセプター発現プラスミドの作製）

（1）エストロゲンレセプター α

ヒトエストロゲンレセプター α をコードするcDNAを取得するために、Genbank Accession NO.M12674に公開されているエストロゲンレセプター α 遺伝子の塩基配列に基づき、フォワードプライマー：5'-CCTGCGGGGACACGGTCTGCACCCTGCCCGCGGCC-3'、および、リバースプライマー：5'-CAGGGAGCTCTCAGACTGTGGCAGGGAAACCCTCT-3'を設計し、DNA合成機（アプライドバイオシステムズ社製モデル394）を用いて合成した。

次に、ヒト肝 cDNA 10ng（クロンテック社製クイッククローンcDNA#7113-1）を鋳型にし、前記のプライマーをそれぞれ10 pmol添加し、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造社製）および該酵素に添付されたバッファーを用いて、反応液量を50 μ lとしてPCR反応を行った。該反応は、PCRsystem9700（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、95℃1分間次いで68℃3分間の保温を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。次いで、該反応液全量を、低融点アガロース（アガロースL：ニッポンジーン）を用いたアガロースゲル電気泳動に

供した。既知配列から予想される大きさのバンドが増幅されていることを確認した後、そのバンドからDNAを回収し、該DNAとダイターミネーターシーケンスキットFS（アプライドバイオシステムズ社製）とを用いてダイレクトシーケンス用のサンプルを調製した。これを、オートシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社製、モデル377）を用いた塩基配列解析に供し塩基配列を確認した。

上記のようにして取得されたDNA約100ngを鋳型にして、フォワードプライマー：5'-CCCAGCCACCATGACCATGACCCTCCACACCAAAGCATCT-3'、および、リバースプライマー：5'-CAGGGAGCTCTCAGACTGTGGCAGGAAACCCTCT-3'を用いたPCRを行い、エストロゲンレセプター α 遺伝子の翻訳開始コドンATGの直前にコザックのコンセンサス配列が付加されたDNAを調製した。すなわち、鋳型となるエストロゲンレセプター α cDNA 0.1 μ g、LA-Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製）、該酵素に添付された反応バッファー、および上記プライマー各10 pmolずつを混合し、反応液量を50 μ lとして、95℃1分間、次いで68℃にて3分間の保温を1サイクルとしてこれを20サイクル行った。このようにして得られた増幅物を低融点アガロースゲル電気泳動法により分離回収した。次にその約1 μ gを、DNA bluntingキット（宝酒造社製）で処理してその末端を平滑化し、これに次にT4ポリヌクレオチドカイネースを反応させてその末端をリン酸化した。該DNAをフェノール処理した後、エタノール沈殿法により精製し、その全量を下記の発現プラスミド作製用のインサートDNAとして用いた。

RSVプロモーターおよびネオマイシン耐性付与遺伝子を含むpRC/RSV（Invitrogen社製）を制限酵素Hind IIIで消化した後、BAPを加えて65℃で1時間保温した。次にフェノール処理・エタノール沈殿によりこれを精製した後、Bluntingキット（宝酒造社製）で処理して末端を平滑化し、低融点アガロース（ニッポンジーン社製；アガロースL）を用いたアガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルからDNAを回収した。回収されたベクターDNA約100ngと、上記のインサートDNA全量を混合し、T4 リガーゼを添加して反応させた。該反応液を大腸菌DH5 α コンピテントセルへ導入し、アンピシリン耐性を示したコロニーからプラスミドDNAを調製し、その塩基配列をABIモデル377型オートシーケ

ンサーを用いてダイターミネーター法で決定した。得られた塩基配列を、前述のダイレクトシーケンスで得られた塩基配列と比較して、翻訳領域の塩基配列が完全に一致していることが確認できたプラスミドを選択し、pRC/RSV-hER α コザックと名づけた。

【0014】

(2) エストロゲンレセプター β

530アミノ酸からなるヒトエストロゲンレセプター β をコードするcDNAを取得するために、フォワードプライマー：5'-TTGAGTTACTGAGTCCGATGAATGTGCTTGCTCTG-3'、および、リバースプライマー：5'-AAATGAGGGACCACACAGCAGAAAGATGAAGCCCA-3'を設計し、DNA合成機（アプライドバイオシステムズ社製モデル394）を用いて合成した。

次に、ヒト脳 cDNA 10ng（クロンテック社製クイッククローンcDNA # 7187-1）を鋳型にし、前記のプライマーをそれぞれ10 pmol添加し、LA-Taqポリメラーゼ（宝酒造社製）および該酵素に添付されたバッファーを用いて、反応液量を50 μ lとしてPCR反応を行った。該反応は、PCRsystem 9700（アプライドバイオシステムズ社製）を用いて、95℃1分間次いで68℃3分間の保温を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。次いで、該反応液全量を、低融点アガロース（アガロースL：ニッポンジーン）を用いたアガロースゲル電気泳動に供した。既知配列から予想される大きさのバンドが増幅されていることを確認した後、そのバンドからDNAを回収し、該DNAとダイターミネーターシーケンスキットFS（アプライドバイオシステムズ社製）とを用いてダイレクトシーケンス用のサンプルを調製した。これを、オートシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社製、モデル377）を用いた塩基配列解析に供し塩基配列を確認した。

上記のようにして取得されたDNA約100 ngを鋳型にして、フォワードプライマー：5'-GCCGCGGCCGCCAGCCACCATGGATATAAAAACTCACCATCTAGCCTTAATTC-3'、および、リバースプライマー：5'-GGGTCTAGAAATGAGGGACCACACAGCAGAAAGATGAAGCCCA-3'を用いたPCRを行い、エストロゲンレセプター β 遺伝子の翻訳開始コドンATGの直前にコザックのコンセンサス配列が付加されたDNAを調製した。すなわち、

鋳型となるエストロゲンレセプター α cDNA 0.1 μ g、LA-Taq ポリメラーゼ（宝酒造社製）、該酵素に添付された反応バッファー、および上記プライマー各10 pmolずつを混合し、反応液量を50 μ lとして、95℃1分間、次いで68℃にて3分間の保温を1サイクルとしてこれを20サイクル行った。このようにして得られた増幅物を低融点アガロースゲル電気泳動法により分離回収した。次にその約1 μ gを、DNA bluntingキット（宝酒造社製）で処理してその末端を平滑化し、これに次にT4ポリヌクレオチドカイネースを反応させてその末端をリン酸化した。該DNAをフェノール処理した後、エタノール沈殿法により精製し、その全量を下記の発現プラスミド作製のインサートDNAとして用いた。

RSVプロモーターおよびネオマイシン耐性付与遺伝子を含むpRC/RSV（Invitrogen社製）を制限酵素Hind IIIで消化した後、BAPを加えて65℃で1時間保温した。次にフェノール処理・エタノール沈殿によりこれを精製した後、Bluntingキット（宝酒造社製）で処理し末端を平滑化し、低融点アガロース（ニッポンジーオン社製；アガロースL）を用いたアガロースゲル電気泳動に供し、バンド部分のゲルからDNAを回収した。回収されたベクターDNA約100 ngと、上記のインサートDNA全量を混合し、T4 リガーゼを添加して反応させた。該反応液を大腸菌DH5 α コンピテントセルへ導入し、アンピシリン耐性を示したコロニーからプラスミドDNAを調製し、その塩基配列をABIモデル377型オートシーケンサーを用いてダイターミネーター法で決定した。得られた塩基配列を、前述のダイレクトシーケンスで得られた塩基配列と比較して、翻訳領域の塩基配列が完全に一致していることが確認できたプラスミドを選択し、pRC/RSV-hER β コザックと名づけた。

【0015】

実施例3 （本発明細胞の作製）

（1）エストロゲンレセプター α

ヒト由来のHeLa細胞に、実施例1で作製されたプラスミドpGL3-TATA-EREx5-BSDのDNA、および、実施例2で作製されたエストロゲンレセプター α の発現プラスミドpRC/RSV-hER α コザックのDNAを、それぞれ直鎖化して導入し、エストロゲンレセプター α の転写調節を受ける遺伝子の転写活性測定に用いるこ

とのできる本発明細胞を作製した。

まず、プラスミドpGL3-TATA-EREx5-BSDのDNA、および、プラスミドpRC/RSV-hER α コザックのDNAをそれぞれSal Iで消化した。

HeLa細胞は、10%FBSを含むDMEM培地（日水製薬社製）を用いて37℃にて5%CO₂存在下に、直径約10cmのシャーレ（ファルコン社製）を用いて培養した。約 5×10^5 の細胞を培養し、翌日、該細胞にリポフェクトアミン（GIBCO社製）を用いたリポフェクション法で、上記の直鎖化されたプラスミドpGL3-TATA-EREx5-BSDのDNAおよびプラスミドpRC/RSV-hER α コザックのDNAを同時に導入した。リポフェクション法の条件はリポフェクトアミンに添付されたマニュアルの記載に従って、処理時間5時間、直鎖化されたプラスミドDNAの総量7 μ g（各々3.5 μ g）/シャーレ、リポフェクトアミン量は21 μ l/シャーレとした。リポフェクション処理後、培地を10%FBSを含むDMEM培地に交換して約36時間培養した。次いで、該細胞をトリプシン処理によりシャーレから剥がして回収し、終濃度800 μ g/mlのG418および終濃度16 μ g/mlのブラストサイジンSが添加された培地の入った培養容器に移し、培地を3日から4日ごとに新しい培地（前記の選択薬剤入り）に交換しながら約1ヶ月間培養した。出現した直径1mmから数mmの細胞コロニーを、あらかじめ培地を分注しておいた96穴ビュープレート（ベルトールド社製）にコロニーごと移し、さらに培養した。細胞がウェルの底面の半分以上を占める程度までに増殖したら（移植から約5日後）、トリプシン処理により細胞を剥がして回収し、三等分して3枚の新しい96穴ビュープレートに播種した。一枚はそのまま継代と培養を続け、マスタープレートとした。残り二枚のうちの一方にはDMSOに溶解させた17 β エストラジオールを終濃度が10nMとなるように加え、もう一方には前記の17 β エストラジオール溶解液と同容積のDMSOを加え、それぞれを二日間培養した。次いでこれら2枚のプレートについて、ウェルから培地を除き、器壁に接着している細胞をPBS(-)で2回洗浄した後、5倍に希釈したPGC50（東洋インキ社製）をウェルあたり20 μ lずつ加えて室温に30分間放置した。該プレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96P（ベルトールド社製）にそれぞれセットし、50 μ lの基

質液 PGL100 (東洋インキ社製) を自動分注して、ルシフェラーゼ活性を測定した。17 β エストラジオールを添加した系の方が、17 β エストラジオールを加えていない系よりも、2倍以上高いルシフェラーゼ活性を示す細胞を選択した。

【0016】

(2) エストロゲンレセプター β

ヒト由来の HeLa 細胞に、実施例 1 で作製されたプラスミド pGL3-TATA-EREx5-BSD の DNA、および、実施例 2 で作製されたエストロゲンレセプター β の発現プラスミド pRC/RSV-hER β コザックの DNA を、それぞれ直鎖化して導入し、エストロゲンレセプター β の転写調節を受ける遺伝子の転写活性測定に用いることのできる本発明細胞を作製した。すなわち、エストロゲンレセプター α の発現プラスミド pRC/RSV-hER α コザックに替えて、エストロゲンレセプター β の発現プラスミド pRC/RSV-hER β コザックを使用し、他は前記 (1) と同様に操作した。得られた形質転換細胞について、前記 (1) と同様に 17 β エストラジオール存在下および 17 β エストラジオール非存在下のルシフェラーゼ活性を測定し、17 β エストラジオールを添加した系の方が、17 β エストラジオールを加えていない系よりも、2倍以上高いルシフェラーゼ活性を示す細胞を選択した。

【0017】

試験例 1 (本発明細胞を用いたレポーターアッセイ)

実施例 3 に記載のようにして作製された本発明細胞を、フェノールレッドフリーの MEM 培地 (日水製薬社製) にチャコールデキストラン処理済み FBS を終濃度 10% となるよう加えた培地を用いて、ルシフェラーゼ発光測定用兼培養用 96 穴プレート (コーニングコースター社製 #3903) に約 2×10^4 細胞/穴ずつ播種し、一晚培養した。次いで、該細胞に、DMSO に溶解させた 17 β エストラジオールを添加した。このとき、17 β エストラジオールの終濃度が試験区ごとに 10 倍ずつ高くなるように、また、全ての試験区の培養液中の最終 DMSO 濃度が 0.1% に揃うように溶解液を調製して添加した。17 β エストラジオールが添加されていない系として、溶媒 (DMSO) のみを加えた対照区を設けた。

これらの細胞を培養し、 17β エストラジオール添加から36時間後に培地を除き、PBS (一) で2回細胞を洗浄した後、5倍に希釈したPGC50 (東洋インキ社製) を $20\mu\text{l}$ ずつ加えて室温に30分間放置した。このプレートを、酵素基質自動インジェクター付きルミノメーターLB96P (ベルトールド製) にセットし、 $50\mu\text{l}$ の基質液PGL100 (東洋インキ製) を自動分注して、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図1および図2に示す。エストロゲンレセプター α の転写調節を受ける遺伝子の転写活性測定用の本発明細胞、および、エストロゲンレセプター β の転写調節を受ける遺伝子の転写活性測定用の本発明細胞のいずれにおいても、細胞に添加された 17β エストラジオール濃度の増加に伴うルシフェラーゼ活性の上昇が認められた。

上記方法と同様にして、 17β エストラジオールに替えて被験化学物質を各試験区に添加して試験することにより、目的とするエストロゲンレセプターに対する被験化学物質のアゴニスト活性を測定することができる。

また、被験化学物質とともに 17β エストラジオールを EC_{50} 値程度の濃度となるように各試験区に添加して上記と同様に試験を行うと、目的とするエストロゲンレセプターに対する被験化学物質のアンタゴニスト活性を測定することができる。

【0018】

【発明の効果】

本発明により、エストロゲンレセプターの転写調節能に対する化学物質の作用を評価するために用いることのできる細胞が提供可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明細胞を用いたレポーターアッセイによって、 17β エストラジオールのエストロゲンレセプター α 活性化能を測定した結果を示す図である。カラムは左から、 17β エストラジオールの溶媒に用いたDMSOのみを添加した区 (DMSO)、終濃度 0.1pM となるよう 17β エストラジオールを添加した区、終濃度 1pM となるよう 17β エストラジオールを添加した区 (1pM E2)、終濃度 10pM となるよう 17β エストラジオールを添加した区、終濃度 100pM となるよう 17β エストラジオールを添加した区 (100pM E2)、終濃度 1nM となるよう 17β

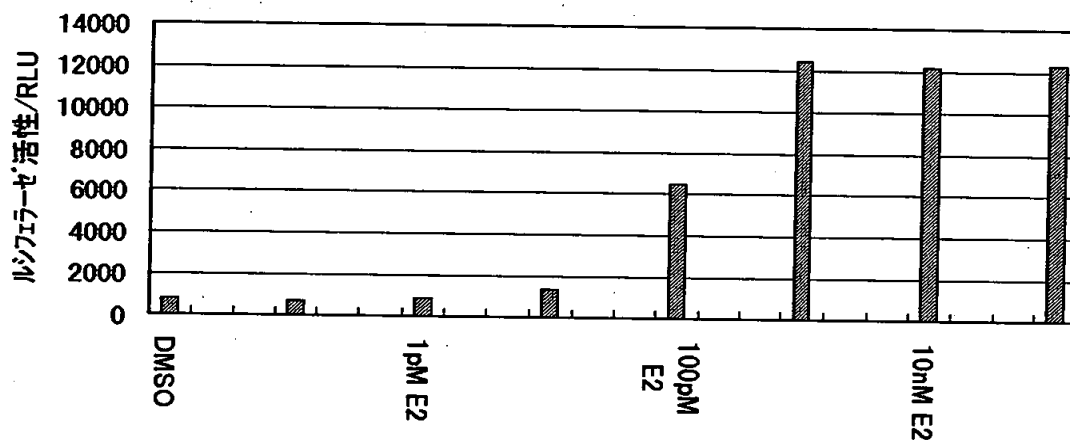
β イストラオールを添加した区、終濃度10nMとなるよう17 β イストラオールを添加した区 (10nM E2)、終濃度100nMとなるよう17 β イストラオールを添加した区を示す。

【図 2】

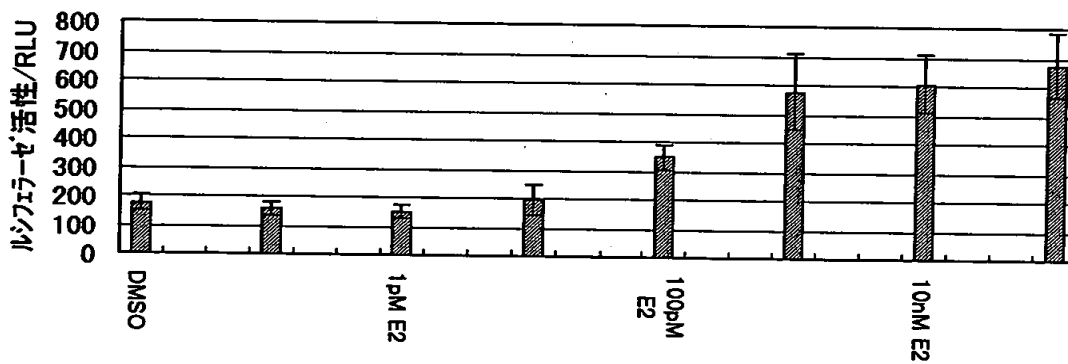
本発明細胞を用いたレポーターアッセイによって、17 β イストラオールのエストロゲンレセプター β 活性化能を測定した結果を示す図である。カラムは左から、17 β イストラオールの溶媒に用いたDMSOのみを添加した区 (DMSO)、終濃度0.1pMとなるよう17 β イストラオールを添加した区、終濃度1pMとなるよう17 β イストラオールを添加した区 (1pM E2)、終濃度10pMとなるよう17 β イストラオールを添加した区、終濃度100pMとなるよう17 β イストラオールを添加した区 (100pM E2)、終濃度1nMとなるよう17 β イストラオールを添加した区、終濃度10nMとなるよう17 β イストラオールを添加した区 (10nM E2)、終濃度100nMとなるよう17 β イストラオールを添加した区を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

化学物質のエストロゲンレセプター活性調節能を測定することのできる試験系を提供すること。

【解決手段】

(1) エストロゲンレセプター遺伝子を発現し、(2) 染色体に、(a) エストロゲンレセプター認識配列と動物細胞で機能可能な最小プロモーターとから実質的に構成される転写調節領域の下流に機能的に接続されてなるレポーター遺伝子と(b) 動物細胞で機能可能な細胞選択マーカー遺伝子とを同一分子上に含むDNAが導入されてなることを特徴とする動物細胞。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
氏 名	住友化学工業株式会社